DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.004


# 维拉帕米对光动力疗法中 SW480癌细胞株内游离钙与光敏剂的影响*

陈祖林** 罗云生 唐建民 廖新华*** 单治堂 (第三军医大学附属新桥医院普通外科) 重庆,400037

提 要 目的:探讨维拉帕米在光动力学治疗结肠癌中增效作用及机制。方法:在结肠癌细胞培养的基础上,采用荧光分光光度法、MTT法、荧光探针法等测定维拉帕米增效后癌细胞内游离钙、癌细胞存活率和细胞内光敏剂含量的变化。结果:维拉帕米可显著增加癌细胞内光敏剂含量和光动力学疗法(PDT)杀伤作用,激光照射后癌细胞存活率与细胞内光敏剂含量呈显著负相关。癌细胞内光敏剂在8~16 h即可达到较高浓度。加维拉帕米后,癌细胞内游离钙降低,激光照射后游离钙明显增加,与癌细胞损伤程度一致。结论:维拉帕米在PDT治疗大肠癌中具有明显的增效作用,胞内游离钙起重要作用。

关键词 游离钙;光动力学疗法;结肠肿瘤;维拉帕米
中图法分类号 R735.35

恶性肿瘤细胞膜上有一种叫 P糖蛋白的转铁蛋白(P-glycoprotein, P-gP)[1],是癌细胞膜多药抗性决定因子,它可把进入癌细胞内的抗癌药泵出到细胞外,维拉帕米(Verapamil, Ver)可与 P-gP特殊位点结合,从而抑制 P-gP功能;我们的研究发现 Ver可明显增强光动力学疗法(Photodynamic therapy, PDT)杀伤肿瘤作用,Ver是一种细胞膜上离子慢通道阻滞剂,其增效规律和对细胞内游离钙的影响如何尚不清楚,本研究探讨 PDT中癌细胞内游离钙与光敏剂变化、PDT杀伤作用规律等,为进一步阐述 Ver在 PDT中增效机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 SW480结肠癌细胞系引自美国凯特林癌症中心(由重庆医科大学范维珂提供)。

1.1.2 光敏剂 PSD-007(简称 PSD)购自第二军医大学药物所,避光-20℃保存。

1.1.3 细胞培养有关试剂 RPMI1640(美国 Life technologies Inc),Hepes(德国),L-Glutamine(第二军医大学),胰蛋白酶(Sigma),小牛血清(西南医院),Verapamil(江苏兴化制药厂)。

1.1.4 噻唑蓝(MTT, Sigma),MTT 5 mg溶于0.01 mol/L PBS 10 ml,配成0.5 mg/ml浓度。

1.1.5 荧光探针 Fura-2/AM(中国科学院上海生理所),Triton X-100(华美生物公司)。

1.1.6 主要设备 RF-540型荧光分光光度计(Shimadzu),Mode12300型 $CO_2$孵箱(Sheldon mamufacturing, Inc),JC-I型 He-Ne激光治疗机(国营南京电子管厂,波长632.8 nm),DG3022 A型酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂),24孔、48孔细胞培养板(Corning New York)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 SW480细胞培养方法 用含青霉素和链霉素分别100 u/ml; FCS10%的 RPMI1640培养液培养,37℃,5% $CO_2$饱和湿度,单层贴壁生长。

1.2.2 实验分组 ①空白对照组;②单独 Ver组;③ PSD组;④ PSD+ Ver组;各组 Ver 0.02 μg/ml, PSD 2 μg/ml。

1.2.3 激光照射 激光(632.8 nm)束垂直照射,光斑直径2 cm,功率密度1.5 mW/$cm^2$,使癌细胞接受能量密度为1 J/$cm^2$[2]。

1.2.4 细胞内 PSD含量测定[3] 采用 RF-540型荧光分光光度计,激发波长394 nm,发射波长610 nm,灵敏度1,狭缝3.3。

1.2.5 癌细胞存活率检测 按 MTT法[4]采用自动酶联免疫检测仪测定光密度 $D_A$,按公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组 } D_A \text{ 值} - \text{空白组 } D_A \text{ 值}}{\text{空白对照组 } D_A - \text{空白组 } D_A \text{ 值}} \times 100\%$$

计算细胞存活率后分别作出杀伤曲线。

1.2.6 癌细胞内游离钙测定 按荧光探针法[5],先将各样品制成单细胞悬液,浓度为$10^5$~$10^7$/ml,加入 Fura-2/AM,使终浓度为5 μmol/L,常规培养40 min, D-Hanks液洗2次,再配成$10^6$个细胞/ml悬液,在 RF-540型荧光分光光度计上测试,激发光栅10 nm,发射光栅10 nm,激发光波长340 nm,发射光波长500 nm,分别测试静息荧光强度 F,最大荧光强度 Fmax(加入 Triton X-100,使终浓度为0.1%),最小荧光强度 Fmin(加入 EGTA,终浓度为3 mmol/L, pH8.7),再根据公式计算细胞内游离钙浓度:

$$[Ca^{2+}] = Kd\frac{F-Fmin}{Fmax-F}(\text{nmol/L})$$

Kd为 Fura-2与 $Ca^{2+}$反应解离常数,为224 nmol/L。

1.2.7 数据处理 均用医用统计 SPLM软件包在计算机上处理。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470672
** 陈祖林,男,33岁,主治医师,讲师,硕士 *** 基础医学部生物物理教研室 重庆,400038
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2 实验结果

各组细胞与含光敏剂的 RPMI1640培养液培养不同时间后细胞内光敏剂含量,浓度为 ng/ml(1 ml含细胞 2× 10⁶个),见图 1 给药 4 h后, PSD+ Ver组各时相细胞内光敏剂量显著高于 PSD组。PSD+ Ver组和 PSD组癌细胞内光敏剂随时间增加的变化规律相似;4、8、16 h时两实验组内分别比相邻前一时相显著增加($P < 0.01$),24 h与 16 h比增加不明显($P > 0.05$);空白对照组与 Ver对照组差别不明显,这里仅选 Ver组。

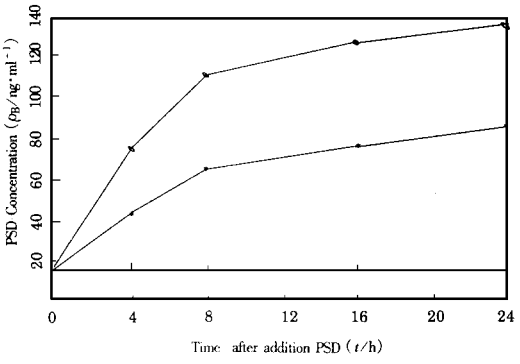



图 1 给药时间与细胞内 PSD关系曲线

**Fig 1 Time-concentration ralationship curve ($n$= 8)**

VER PSD PSD+ Ver

给药时间与 PDT杀伤作用关系:测试了各组细胞与含 PSD的 RPMI1460作用不同时间后,每组在激光照射 8 h后细胞存活率,结果见图 2 结果表明,癌细胞与光敏剂作用 8~ 16 h可达到满意 PDT杀伤效果;16 h与作用 24 h相比细胞存活率差别不显著,8 h与 4 h比、16 h与 8 h比显著降低($P < 0.01$)。

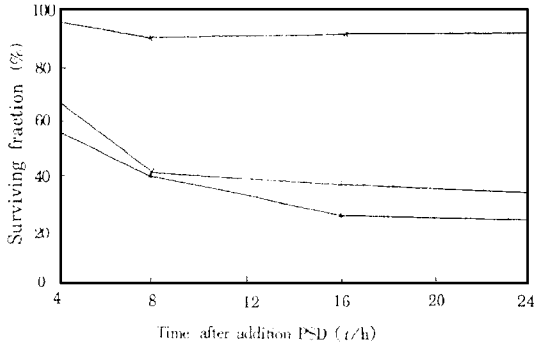



图 2 细胞存活率与给药时间关系曲线

**Fig 2 Time-concentration-effect relationship, measured by MTT assay ($n$= 8)**

VER PSD PSD+ Ver

Ver在 PDT增效过程中对癌细胞内游离钙浓度的影响见图 3,细胞内游离钙浓度给药后 16 h, PSD+ Ver组(108± 10.4 nmol/L)明显低于 PSD组(124± 8.2 nmol/L)($P < 0.01$);PDT后 16 h,两组细胞内游离钙明显升高,尤以 PSD+ Ver组升高到 460± 70.4 nmol/L,明显高于 PSD组 380± 43.7 nmol/L。

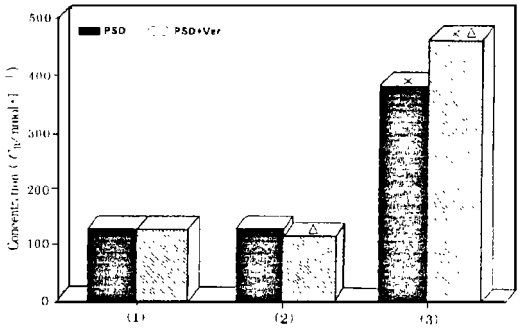



图 3 细胞内游离钙浓度

(1)对照组 (2)照射前 (3)照射后 16 h

**Fig 3 Intracellular concentration of free $Ca^{2+}$ ($n$= 8)**

(1) control (2) Before irradiation (3) After irradiation 16 hours △: $P < 0.01$ *vs* group PSD; * : $P < 0.01$ *vs* that before irradiation

## 3 讨论

光动力学疗法已作为治疗胃肠肿瘤有效的方法之一,对早期癌症可达到完全治愈目的。但现有的光敏剂专一性和选择性不强,增加光敏剂在肿瘤细胞或肿瘤内滞留是增效作用的重要方法之一。已有研究表明癌细胞具有明显的抗药性,其机制主要在于癌细胞膜上存在一处多药抗性的决定因子 P-gP,它是一种具有 ATPase活性的细胞膜外流泵,分子量为 170× $10^3$ u,它在癌细胞过度表达是多药抗性的机制之一[7]。P-gP通过跨膜泵模式促进药物外流而减少细胞内药物浓度,也可能是作为一种"换位酶"增强已进入细胞的药物外流,起到抗药性作用。Ver因可抑制 P-gP功能,纠正了癌细胞的抗药性,使癌细胞内药物增多。本结果表明:加入 Ver实验组癌细胞内光敏剂都显著增多,PDT杀伤作用也显著增强,可见 Ver对光动力学治疗结肠癌的增效作用是肯定有效的,我们采用 Ver剂量浓度为 0.02 μg/ml,属超低浓度,这种剂量 Ver本身对正常细胞和肿瘤细胞都无明显影响,图 2显示单独 Ver对 SW480癌细胞存活率无明显影响。加入 Ver后 4、8、16 h癌细胞内光敏剂较相邻前一时相明显增加($P < 0.01$),24 h与 16 h比有轻微增加($P > 0.05$);这表明,Ver主要在加药后 16 h内增加癌细胞内光敏剂,24 h可达到相对"饱和"状态;激光照射后,细胞存活率曲线也表明这一特点。Kinsey[8]报道,给光敏剂后 4~ 8 h照射可达到 PDT良好效果,但是否为最佳,未见有进一步研究报道,原则是使细胞内光敏剂含量能达到完全杀死肿细胞所需浓度为准。Chan[6]已把 Ver与抗癌药联合用于治疗神经母细胞瘤,比单用抗癌药获得更满意效果,因此在临床 PDT治疗大肠癌过程中, Ver

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可能是一种很有前途的增效剂,亦有报道癌细胞的多药抗性与 P-gP无关[7],但 Ver可使大肠癌细胞内光敏剂增加则为我们实验所证实,具体机制有待进一步研究。

Ver是一种钙离子通道阻滞剂,它可作用于细胞膜钙离子门控通道,有研究表明,它必须通过细胞膜达到其钙通道的内口受点才起到钙通道阻滞作用。本结果表明,加入 Ver后激光照射前癌细胞内游离钙明显减少,此时癌细胞内光敏剂却明显增多,可能系 Ver抑制了癌细胞膜上 P-gP的功能,使进入癌细胞的光敏剂被自然排出的能力降低;另一原因可能由于癌细胞膜内外游离钙失衡,直接影响到癌细胞膜特异性通透性,导致光敏剂内流,癌细胞内光敏剂增多,可能存在光敏剂与 $Ca^{2+}$ 的互换。激光照射后,癌细胞内游离钙迅速明显增加,其原因可能在于:① 因 PDT首先作用是质膜系统,癌细胞膜上钙通道被蛋白激酶 C激活[9],导致细胞外游离钙大量内流;② PDT直接损伤到癌细胞膜使膜正常功能减低或丧失,Ver失去作用,膜的通透性增加;③ 因 PDT可损伤内质网、线粒体等胞内质膜系统,可导致胞内内质网钙池、线粒体蓄存游离钙的释放[10];④ 癌细胞膜外游离钙大量内流,胞内器官游离钙的释放,致胞内游离钙超载可激活质膜中某些游离钙依赖性磷脂酶,使质膜降解,产生毒性物质;且可能加速 ATP的耗竭等,从而反过来进一步加重癌细胞膜、线粒体膜、内质网膜等的损伤,导致恶性循环。Allaith[5]研究发现光敏剂四硫铝肽氰本身可激活癌细胞膜上能量和钙依赖性激活和转运途径,使细胞内游离钙增加;本结果并不支持这种观点,可能与我们用的光敏剂 PSD不同的结果,详细机制不清楚。从此看来细胞内游离钙变化在 PDT中的作用还非常繁杂,对研究 PDT杀伤癌细胞机制有重要意义,有必要做深入研究。

## 参考文献


1 Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil. Cancer Res, 1989, 49(18): 5002

2 陈祖林,唐建民,单志堂,等.癌细胞光动力学作用中激光剂量测定方法.激光杂志, 1996, 17(6): 311

3 陈祖林,单志堂,罗云生,等. SW480癌细胞内光敏剂含量检测.中华物理医学杂志, 1997, 19(2): 72

4 Merlin J L, Azzi S, Ligenon D, *et al*. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of humen tumor cell to photodynamic therapy. Eur J Cancer, 1992, 28(8-9): 1452

5 Allaith M, Matthews E K. Calcium dependent photodynamic di-and tetrasulphonate aluminium pathalocyanine on normal and tumor-derived rat pancreatic exocrine cell. Br J Cancer, 1994, 70(5): 893

6 Chan H S, Haddad G, Thorner P S, *et al*. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. N Eng J Med, 1991; 325(23): 1608

7 邱　嵘.肿瘤多药抗性的细胞模型.国外医学:肿瘤学分册, 1994, 21(3): 149

8 Kinsey J H, Cortese D A, Moses H L, *et al*. Photodynamic effect of hematoporphyrin derivative as a function of optical spectrum and incident engergy density. Cancer Res, 1981, 41(12): 5020

9 Gopalakrishna R, Anderson W B. Ca and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(10): 6758

10 Benhur E, Dubbelman T M. Cytoplasmic free calciun changes as trigger mechanism in the response of cell to photosensitisation. Photochem Photobiol, 1993, 58(5): 890


(收稿: 1998-02-18;修回: 1998-05-27)

(编辑　汪勤俭)

# Effects of verapamil on intracellular photosensitizer and free calcium in colon adenocarcinoma cell lines during photodynamic therapy*

Chen Zulin, Luo Yunsheng, Tang Jianmin, Liao Xinhua, Shan Zhitang (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

**Abstract** **Objective**: To explore the synergistic role and mechanism of verapamil in photodynamic therapy of colonic neoplasm. **Methods**: After the colon adenocarcinoma cell lines were cultured and treated with photodynamic therapy added with verapamil, the changes of the cell survival rate and contents of intracellular photosensitizer and free calcium were determined with fluorescence probe, fluorescence spectrophotometry and MTT assay. **Results**: The content of the intracellular photosensitizer was significantly increased and

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39470672

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

killing power of photodynamic therapy enhanced by verapamil (0.02 μg/ml). The cell survival rate was reversally correlated with the content of intracellular photosensitizer. After adding verapamil, the content of intracellular free calcium was markedly decreases. It was significantly increased after laser irradiation, which was consistent with injurious severity of the cancer cells. **Conclusion**: Verapamil can play remarkable synergistic role in photodynamic therapy of colonic adenocarcinoma.

**Key words** free calcium; photodynamic therapy; colonic neoplasm; verapamil

# A超与 B超测量眼轴误差的探讨

# Discussion on the errors of eye axis determined by A mode and B mode ultrasonography

王维光* 曾登芬 (第三军医大学附属大坪医院眼科) 重庆, 400042

超声波对活眼解剖结构生物学测定及其准确性已有许多报告。而眼轴长度测量是计算人工晶体屈光度最重要因素之一[1,2]。惟未见在同一眼 A超生物测量和 B超测量眼轴差异的详细报告,我们对一组白内障人工晶体植入病人采用两种测量方法对同一眼进行轴长测量,探讨提高测量眼轴的精确性。

## 1 材料与方法

本组随机检测白内障后房型人工晶体植入病人 60人, 60眼,右眼 28眼,左眼 32眼;其中男性 32人,女性 28人,年龄最大 84岁,最小 11岁,平均 44.3岁。

60只眼轴长测量手术前进行。采用 HUMPHREY INSTRUMENTS 837型眼科专用 A/B超声仪,探头频率为 10 mHz,灵敏度 80 dB。A超生物测量在表麻下直接接触角膜测量,自动校正,显示 5次测量的平均值记录打印; B超测量在上睑涂少许耦合剂,将探头垂直放在眼睑上轴位扫描,当视神经与晶体同在一扫描平面时,固定图像,再以超声尺测得眼球壁前后轴长(减去 2 mm眼睑厚度)。

## 2 结果

A超生物测量眼轴 60眼,最短 20.53 mm,最长 32.79 mm,平均 24.61 mm。B超测量眼轴最短 20.18 mm,最长 30.68 mm,平均 25.10 mm。两组之间平均差值为 0.49 mm,经统计学处理($t$检验)均值差异不显著($P > 0.05$)。眼轴与性别: A超测量男性 32眼,平均 24.36 mm,女性 28眼,平均 24.72 mm,女性比男性眼轴长多 0.36 mm; B超测量男性 32眼,平均轴长为 25.05 mm,女性 28眼,平均为 24.83 mm,男性比女性轴长多 0.22 mm。

## 3 讨论

影像技术生物测量眼轴方法较多,但临床上仍以超声波生物测量眼轴最常用,它具有操作简便、重复性好、无副作用优点,目前已列为白内障人工晶体植入术常规检查。本组 60眼在同一眼采用 A超与 B超同时测量眼轴,结果 A超平均轴长为 24.62 mm, B超平均轴长为 25.10 mm,比周文炳等[3]报告 22.66 mm眼轴偏长,这与本组多数病人发生白内障之前存在屈光不正有关。同时表明 A超与 B超测量眼轴误差小,所以在没有眼科专用 A/B超时,全身 B超仪配以 10 mHz专用探头,尽量减少操作误差,将眼轴长度测量结果代入 SRKII 公式计算的人工晶体度数是比较准确的。我们认为准确的眼轴测量除了有先进的仪器之外,尽量减少操作上的误差是十分重要的。HUMPHREY INSTRUMENTS 837型是目前较公认的眼科专用 A/B超声仪,由电脑控制,自动校正检测误差,当测量每次误差> 0.2 mm时,不被电脑认可,因此减少了操作不当的误差。为了减少操作上误差,我们体会有几点:① 进行 A超生物测量时,双眼应同时滴表麻药 3次,使非测量眼保持较稳定的注视点;② 同一眼作 A/B超时,应先作 A超再作 B超,以免耦合剂粘附角膜表面;③ 尽量使探头声束与眼球的视轴处于同轴状态,从而出现角膜与视网膜波峰高度接近或等高,测量的准确性愈高;④ 若 5次结果数据储仪器自动系统不显示眼轴平均值,需取消重作;⑤ B超测量眼轴长度时应同时显示晶体光斑及视神经,否则误差较大;⑥ 无论 A超和 B超测量眼轴,操作时切勿压迫眼球和挤眼是十分重要的。

关键词 A超; B超;眼轴
中图法分类号 R776

## 参考文献

1 戴 虹,刘向利.人工晶体术前减少眼轴测量误差的探讨.中华眼科杂志, 1997, 33(1): 61
2 Francois J, Goes F. Ultrasonographic study of 100 emmetropic eyes. Ophthalmologica, 1977, 175(4): 321
3 周文炳,吴中耀.265只正常眼的活体结构超声测定.中华眼科杂志, 1982, 18(3): 210

(收稿: 1998-04-12;修回: 1998-08-10)
(编辑 汪勤俭)

* 王维光,男, 44岁,副教授

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net